

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663**Generel information****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 er en genomredigeret human osteosarkomcellelinje afledt af U2OS-celler, hvor det endogene RANBP2-lokus (også kendt som NUP358) er blevet modificeret ved hjælp af CRISPR/Cas9 til at kode for et SNAPf-tag i rammen med det oprindelige protein. Nup358/RanBP2 er et stort nukleoporin, der er lokaliseret i cytoplasmatiske filamenter i nukleoporekomplekset (NPC) og spiller en afgørende rolle i nukleocytoplasmatiske transport, SUMOylering og mitotiske processer. Endogen mærkning sikrer, at SNAPf-Nup358 udtrykkes under fysiologisk promotorkontrol, hvilket opretholder native ekspressionsniveauer og minimerer artefakter forbundet med overekspressionssystemer.

SNAPf-tagget er en hurtigt mærkende variant af SNAP-tagget, der kovalent binder benzylguanin-konjugerede substrater, hvilket muliggør selektiv og stabil fluorescerende mærkning af Nup358 i levende eller fiksede celler. I U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler lokaliseres fusionsproteinet til kernehinden i en punktformet fordeling, der er karakteristisk for cytoplasmatiske NPC-filamenter. Denne konfiguration understøtter højopløsningsfluorescensbilleddannelse, superopløsningsmikroskopi, puls-chase-mærkning og enkeltmolekylsporing til at studere NPC-arkitektur og -dynamik. Den flade morfologi og de store kerner i U2OS-celler letter yderligere kvantitativ billeddannelse af kernemembranstrukturer.

Denne model muliggør undersøgelse af Nup358-specifikke roller i CRM1/exportin-afhængig nuklear eksport, Ran GTPase-cyklusregulering og den rumlige organisering af cytoplasmatiske transportplatforme. I betragtning af Nup358's involvering i mitotisk spindelmontering og kinetokorfunktion er cellelinjen også velegnet til at studere cellecycklusafhængig omfordeling af nukleoporiner og NPC-adskillelse/genmontering under mitose. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 udgør en fysiologisk relevant platform til at analysere strukturelle og funktionelle aspekter af den cytoplasmatiske side af kerneporekomplekset i humane celler.

Organism Menneske**Tissue** Knogle**Disease** Osteosarkom**Metastatic site** Primær tumorlokalisering (knogle)**Applications** Biologi vedrørende cytoplasmatiske filamenter i kerneporekomplekset; Nup358/RanBP2 i CRM1-medieret eksport fra kernen; Ran-GTPase-cyklus; SUMO-signalvejen; samling af mitotisk spindel; sporing af enkeltpartikler; superopløsningsmikroskopi; SNAP-pulse-chase-mærkning; arkitekturen på den cytoplasmatiske side af NPC'et**Karakteristika****Age** 15 år**Gender** Kvinde

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663

Ethnicity	Kaukasisk
Morphology	Epitel-lignende
Cell type	Epithelceller (osteosarkom)
Growth properties	Vedhæftende

Regulatoriske data

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytion katalognummer 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Ikke tildelt (CRISPR-modificeret U2OS-derivat; forælder-U2OS CVCL_0042)
Depositor	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Denne humane osteosarkomcellelinje (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) indeholder en CRISPR-konstrueret SNAPf-Nup358/RanBP2-fusion, der muliggør præcis mærkning af cytoplasmatiske fibriller i nukleare porer. Modifikationen er stabilt integreret. Denne klassificering gælder kun i Tyskland og kan variere andre steder.

Biomolekylære data

Protein expression	Nup358/RanBP2, SNAPf-tag
---------------------------	--------------------------

Håndtering

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glukose, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytion artikelnummer 820200a)
Supplements	Suppler mediet med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1 % NEAA
Dissociation Reagent	Accutase

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663

Doubling time ca. 24 til 36 timer

Subculturing Fjern det gamle medium fra de klæbende celler, og vask dem med PBS, der ikke indeholder calcium og magnesium. Brug 3-5 ml PBS til T25-kolber og 5-10 ml til T75-kolber. Dæk derefter cellerne helt med Accutase, brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber. Lad cellerne inkubere ved stuetemperatur i 8-10 minutter for at løsne dem. Efter inkubationen blandes cellerne forsigtigt med 10 ml medium for at resuspendere dem, og centrifugeres derefter ved 300xg i 3 minutter. Kassér supernatanten, resuspender cellerne i frisk medium, og overfør dem til nye kolber, der allerede indeholder frisk medium.

Split ratio 1 til 3

Seeding density 1 til 3×10^4 celler/cm²

Fluid renewal 2 til 3 gange om ugen

Freeze medium Som kryopræservesmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmobybeskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryo-induceret stress.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663

Thawing and Culturing Cells

1. Bekræft, at hætteglasset forbliver dybfrosset ved levering, da cellerne sendes på tøris for at opretholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved modtagelsen skal du enten straks opbevare kryohætteglasset ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at sikre, at cellernes integritet bevares, eller gå videre til trin 3, hvis øjeblikkelig dyrkning er påkrævet.
3. Ved øjeblikkelig dyrkning optøs hætteglasset hurtigt ved at nedsænke det i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vandbad med rent vand og et antimikrobielt middel og røre forsigtigt i 40-60 sekunder, indtil der kun er en lille isklump tilbage.
4. Udfør alle efterfølgende trin under sterile forhold i en flowhætte, og desinficer kryovialet med 70 % ethanol, før det åbnes.
5. Åbn forsigtigt det desinficerede hætteglas, og overfør cellesuspensionen til et 15 ml centrifugerør, der indeholder 8 ml kulturmedium ved stuetemperatur, og bland forsigtigt.
6. Centrifuger blandingen ved $300 \times g$ i 3 minutter for at adskille cellerne, og kassér omhyggeligt supernatanten, der indeholder resterende frysemedium.
7. Resuspender forsigtigt cellepelleten i 10 ml frisk dyrkningsmedium. For klæbende celler deles suspensionen mellem to T25-kulturkolber; for suspensionskulturer overføres alt mediet til en T25-kolbe for at fremme effektiv celleinteraktion og -vækst.
8. Overhold etablerede subkulturprotokoller for fortsat vækst og vedligeholdelse af cellelinjen, hvilket sikrer pålidelige eksperimentelle resultater.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , befugtet atmosfære.

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

Shipping Conditions

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663

Storage Conditions

For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

Kvalitetskontrol / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder.

For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.